

X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良基因剪接受体突变对 mRNA 加工的影响

罗 强¹, 高 超², 王怀立¹, 周建华¹, 高铁铮¹

(1. 郑州大学第一附属医院儿科, 郑州 450052; 2. 郑州市儿童医院, 郑州 450053)

摘要: X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良(spondyloepiphyseal dysplasia tarda, SEDL)是一种罕见的由 *SEDL* 基因突变引起的骨软骨发育障碍性疾病,病变主要累及腰椎和近端承重大关节。为研究 *SEDL* 基因剪接受体突变(IVS2 -2A→C)对 mRNA 加工的影响,从该突变所致 SEDL 患者,以及健康对照者外周血中提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以此为模板进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),对 PCR 扩增产物采用双向直接测序和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)方法进行分析。测序结果发现 IVS2-2A→C 突变患者的一种 cDNA 外显子 2 与外显子 4 直接拼接,显示外显子 3 全部丢失;另一种 cDNA 外显子 1 与外显子 4 拼接,显示外显子 2 和外显子 3 均缺失;在健康对照者也发现了外显子 2 缺失的 cDNA。PAGE 发现患者和对照者都存在两种 RT-PCR 产物,长度分别为 567 bp、425 bp 以及 679 bp、537 bp,证实了测序结果。这说明 *SEDL* 基因第二内含子剪接受体突变(IVS2-2A→C)导致其外显子 3 在 mRNA 加工过程中全部丢失,由于 *SEDL* 基因的翻译起始位点位于外显子 3,它的缺失可能使生成的 mRNA 不能被翻译,从而引起 SEDL 发生;外显子 2 位于 5' UTR,它的缺失提示 *SEDL* 基因存在选择性剪接,正常人也存在缺失外显子 2 的 cDNA,说明这种选择性剪接对临床表型的影响似乎并不大,它对基因表达水平和表达调控是否有影响还需要进一步研究。

关键词: 迟发性脊椎骨骺发育不良; *SEDL* 基因; 选择性剪接; 逆转录; 剪接受体

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)04-0544-05

Effect of A Novel Splicing Mutation(IVS2-2A→C) of *SEDL* Gene on RNA Processing

LUO Qiang¹, GAO Chao², WANG Huai-Li¹, ZHOU Jian-Hua¹, GAO Tie-Zheng¹

(1. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. The Children Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450053, China)

Abstract: X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDL) is a rare osteochondrodysplasia caused by the mutation of *SEDL* gene, which mainly involves vertebral bodies and hips. To explore the effect of the novel splicing mutation (IVS2 -2A→C) of *SEDL* gene on mRNA processing in a large Chinese family with X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda and to elucidate the molecular base of SEDL, total RNA was isolated from EDTA blood samples of patients and controls. RT-PCR was performed on total RNA. cDNA was analyzed by bi-directionally direct sequencing of PCR products and Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Sequencing analysis revealed that there were two kinds of cDNA in patients. One is that exon 2 directly spliced exon 4, that is, exon 3 absence from the mature mRNA;

收稿日期: 2004-06-10; 修回日期: 2004-11-17

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究项目(编号: 2003320140) [Supported by the Natural Science Research Fund of Henan Education Department (No. 2003320140)]

作者简介: 罗 强(1963—), 男, 河南平顶山人, 副教授, 博士, 专业: 小儿神经疾病

通讯作者: 高 超(1963—), 男, 河南开封人, 医学硕士, 专业: 小儿神经疾病。E-mail: gaochao39@371.net

致 谢: 澳大利亚阿德莱德大学 Gecz 博士和河南省分子医学重点实验室范清堂老师对实验工作给予了大力支持, 此致谢意。

and the other is that exon 1 directly spliced exon 4, meaning both exon 2 and 3 being spliced out completely. Meanwhile one kind of cDNA that exon 1 directly spliced exon 3 was found in normal controls. By PAGE, RT-PCR amplified products, 679 bp and 537 bp, were detected in normal controls, while 567 bp and 425 bp fragments were found in affected individuals. Our data show that the mutation of the splice-acceptor site in intron 2 causes exon 3 entirely exclusion from the mature RNA transcripts in affected individuals. As the translation start site of the *SEDL* gene locates on exon 3, the splicing defect causes affected individuals failure to produce sedlin, which elucidates the causative role of *SEDL* gene in the pathogenesis of SEDL. The absence of exon 2 indicates that there is alternative splicing in *SEDL* gene. The alternative splicing was also found in normal controls, which demonstrated that the alternative splicing might not be related to the phenotype of SEDL. Because the alternative splicing of exon 2 occurred in the 5' UTR, it is not clear whether it affects the gene expression.

Key words: spondyloepiphyseal dysplasia tarda; *SEDL* gene; reverse transcript; alternative splicing; splice acceptor

X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良 (spondyloepiphyseal dysplasia tarda, SEDL) 是一种少见的主要累及脊椎椎体和身体承重大关节, 具有遗传异质性的骨软骨发育障碍性疾病, 出生时无任何异常, 在儿童中后期发病。临床特点为短躯干性侏儒和进行性的大关节退行性变, 常伴有桶状胸和脊柱侧弯, X线检查腰部椎体前部上下缘凹陷、中后部呈驼峰状突起, 及椎间隙狭窄等^[1,2]。SEDL 基因被定位于 Xp22, 有 6 个外显子, 第 3~6 外显子为编码外显子, 翻译起始密码位于外显子 3, 翻译产物被称为 sedlin^[3]。我们在国内率先对汉族人中一个 SEDL 大家系进行了分子遗传学研究, 发现了 *SEDL* 基因第二内含子剪接受体突变 IVS2-2A→C^[4]。为研究该突变对 mRNA 剪接的影响, 应用 RT-PCR、PAGE 和双向测序方法对该家系进行了 *SEDL* 基因转录水平的研究, 报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

研究对象来自中国河南的一个 SEDL 大家系^[5], 该家系符合 X-连锁隐性遗传, 先证者和另外两个受累者经过细致的临床和放射学检查, 具有典型的 SEDL 特征, 家系调查证实其他患者临床症状与先证者相似。无血缘关系的健康人设为对照。

1.2 方法

1.2.1 Total RNA 的抽提

采用 QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) RNA 提取试剂盒从 EDTA 抗凝血中提取总 RNA, 变性琼脂糖电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度后立即用于逆转录或 -80℃ 保存备用。

1.2.2 RT-PCR

逆转录反应体系: 逆转录 Buffer 5 μL, RNase 抑制剂 (LY2001, USA) 20 U, 随机六聚引物 100 pmol, dNTPs 25 nmol, 逆转录酶 XL (AMV; TaKaRa, 大连) 10 U, 总 RNA ≤ 1 μg, 无 RNase 去离子水加至 20 μL。室温放置 10 min, 42℃ 水浴 1h, 立即置于冰水中 2 min, 反应产物直接用于 PCR 反应或 -20℃ 保存备用。PCR 扩增引物由 Geck 博士惠赠 (University of Adelaide Department of Pediatrics and Genetics, Australia)。引物序列: E1F2 (5'-CTT CCG CGG AAA CTG ACA TTG C-3') and SEDL 5Rx (5'-GTA TAC ACC ATT GTG GTG ACA TC-3'), 扩增片段长度 679 bp, 跨 1~6 外显子。25 μL PCR 反应体系: 10× PCR buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 上、下游引物各 25 pmol, Taq DNA 聚合酶 (Premega) 2.5 U, cDNA 模板 5 μL。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 接 94℃ 45 s, 60℃ 60 s, 72℃ 60 s 35 个循环, 之后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.3 序列分析

PCR 扩增产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外透射仪下显示扩增成功后, 从凝胶上切取目的 DNA 条带, 用 QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收 DNA 片段。纯化 DNA 片段用 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas) 定量。取纯化的 DNA 模板 40 ng, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit mix 2 μL, 测序引物 (同 PCR 扩增引物) 10 pmol 组成 8 μL 反应体系进行测序 PCR。反应条件: 98℃ 1 min, 96℃ 30 s, 50℃ 30 s, 60℃ 4 min, 25 个循环。测序模板纯化后在 95℃ 水浴 5 min, 立即置于冰水中 5 min 将其淬灭成单链, 转移至测序管, 在 ABI Prism™ 310 Genet-

ic Analyzer 全自动序列分析仪上进行毛细管电泳测序。

1.2.4 PAGE 检测

将纯化的 PCR 扩增产物进行 5 % 非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双甲叉丙烯酰胺=29:1)电泳。取 5 μL 样本与等体积载样缓冲液混匀上样,待二甲苯青电泳至凝胶四分之三处时结束电泳。将聚丙烯酰胺凝胶在体积分数为 0.1 的冰醋酸中固定 20 min,去离子水清洗 3 次,每次 2 min,在 1 g/L 的硝酸银溶液(含 0.05% 甲醛)中染色 30 min,去离子水清洗 10 s,在显色液(30 g/L 碳酸钠,2 mg/L 硫代硫酸钠)中显色至出现清晰条带后用体积分数为 0.1 的冰醋酸固定 5 min,读胶,拍照。

2 结果

2.1 RT-PCR 序列分析

用引物 E1F2 和 SEDL 5Rx 扩增 SEDL 基因 cDNA 全部 6 个外显子片段长度为 679 bp,外显子 2

全长 142 bp,外显子 3 全长 112 bp。cDNA 正,反双向测序结果显示患者 SEDL 基因有两种类型的 cDNA。一种 cDNA 第二外显子与第四外显子拼接,显示外显子 3 缺失(图 1, A);另一种 cDNA 的第一外显子与第四外显子直接拼接,意味着外显子 2 和 3 同时缺失(图 1, B)。在健康对照者也发现了外显子 2 缺失的 cDNA(图 1, C)。

2.2 PAGE 检测

聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 SEDL 患者存在两种片段,长度分别对应预测的 567 bp 和 425 bp,前者提示外显子 3 丢失,后者为外显子 3 和 2 同时缺失;健康人的 SEDL 基因 cDNA 也存在两种片段,长度分别对应预测的 679 bp 和 537 bp,前者包含有全部六个外显子,后者缺失外显子 2(图 2)。上述结果说明 SEDL 基因第二内含子剪接受体突变(IVS2-2A→C)导致其第三外显子在 mRNA 加工过程中全部丢失,而外显子 2 同时缺失提示 SEDL 基因存在选择性剪接。

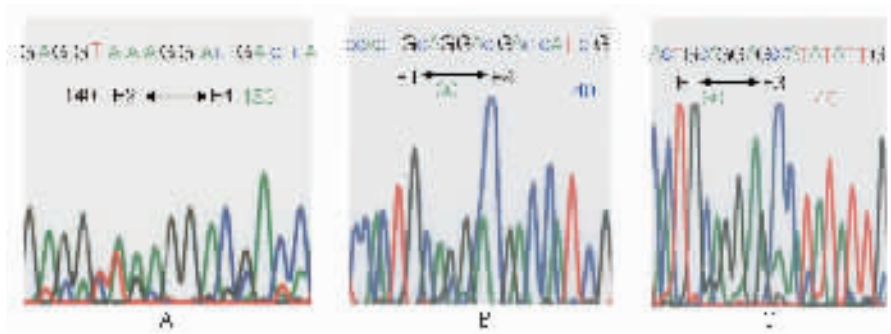


图 1 SEDL 基因 cDNA 测序结果,箭头所指为外显子

A: SEDL 患者外显子 2 与外显子 4 拼接的 cDNA,显示外显子 3 缺失; B: SEDL 患者外显子 1 与外显子 4 拼接的 cDNA,显示外显子 2 和外显子均 3 缺失; C: 健康对照者外显子 1 与外显子 3 拼接的 cDNA,显示外显子 2 缺失。

Fig.1 Directional sequencing of cDNA from SEDL gene, Arrows indicate the number of exon

A: cDNA of which exon 2 was directly spliced to exon 4 in male affected, that is, exon 3 was skipped from the SEDL transcripts; B: cDNA of which exon 1 was directly spliced to exon 4 in male affected, meaning both exon 2 and exon 3 skipped from the SEDL transcripts; C: cDNA of which exon 1 was directly spliced to exon 3 in normal control, meaning exon 2 skipped from the SEDL transcripts.



图 2 SEDL 患者和正常人 SEDL 基因 RT-PCR 产物 PAGE 结果

M: DNA 分子量标准; P: 患者 cDNA 两种扩增片段长度分别为 567 bp 和 425 bp; N: 健康对照者 cDNA 两种扩增片段长度分别为 679 bp 和 537 bp; g: gDNA 作为对照模板; Z: 未加入 DNA 模板; E: 外显子; +: 存在; -: 缺失。

Fig.2 Polyacrylamide gel electrophoresis of RT-PCR amplified products of SEDL gene in patients and normal controls

M: DNA marker; P: fragments of 567 bp and 425 bp, RT-PCR amplified products of patients; N: fragments of 679 bp and 537 bp, RT-PCR amplified products of normal controls; g: gDNA used as control templet; Z: no DNA used as templet; E: exon; +: presence; -: absence.

3 讨 论

SEDL 基因是一个高度保守的基因,与酵母、线虫、果蝇等不同种属的生物具有很高的同源性^[3]。迄今为止所发现的 20 余种 SEDL 基因突变都发生在 4 个编码外显子及其侧翼区的内含子。在已发现的 SEDL 致病基因突变型中,编码外显子侧翼区的内含子剪接位点一致序列(consensus sequence)中关键核苷酸改变引起的 mRNA 剪接异常具有相当高的发生率(约 30%),远高于 15% 的平均发生率^[6],提示剪接点突变在 SEDL 的分子发病机制中有较突出的地位。

目前对 SEDL 基因剪接位点突变对 mRNA 剪接加工的影响研究很少。在初级转录本剪接加工过程中若内含子剪接供体和剪接受体的核苷酸一致序列中关键核苷酸发生改变,则会使 mRNA 发生剪接错误^[7]。我们的实验结果证实了 SEDL 基因 IVS2 -2A→C 突变导致紧随其后的外显子 3 完全缺失。表明 SEDL 基因剪接点突变对其 mRNA 成熟和蛋白翻译有非常重要的影响。一般来说,真核细胞的蛋白是从 mRNA 上第一个 ATG 起始密码开始翻译,只有两种情况例外:一是第一个 ATG 密码后面很快出现终止密码,另一个是上游的 ATG 密码相邻的核苷酸序列不符合扫描核糖体能识别的一致序列(GCCACCATGG),特别是-3 位的嘌呤和+4 位的 G^[8]。虽然 SEDL 基因外显子 3 后面的外显子中也存在几个 ATG 密码,但他们都不具有作为翻译起始点的一致序列,而 5'端第二外显子上的两个 ATG 密码不但缺少起始点一致序列,而且其后很快出现终止密码,也不可能作为翻译起始密码。因此,外显子 3 的缺失将可能导致受累者不能编码任何 SEDL 蛋白。SEDL 基因编码蛋白参与构成转运蛋白粒子(transport protein particle, TRAPP),TRAPP 在内质网至高尔基体的运输囊泡与它们的受体区之间的定位和融合过程中发挥关键作用^[9]。SEDL 编码蛋白的功能缺陷将导致细胞内质网和高尔基体之间的物质运输出现障碍,由此引起 SEDL 的发生。

任何一个人体细胞都表达有十万以上不同种类的蛋白质。目前认为人类基因组的基因数量不会超过 35 000 个,这意味着一个基因平均要编码 3 个以上的蛋白产物^[10, 11]。选择性 RNA 合成和加工为人类基因组编码多样性一种重要方式。越来越多的研

究表明选择性剪接对完成生物的复杂生命活动起着非常重要的作用,对选择性剪接的研究已成为一个进展很快的“热点”领域^[12, 13]。我们的研究证实 SEDL 基因的 5'UTR 区存在选择性剪接。因为这种选择性剪接发生在 5'UTR 区,它并不改变 SEDL 基因的可读框(open reading frame, ORF),所以也不引起翻译产物氨基酸序列的改变。正常人外显子 2 的缺失也说明 mRNA 的这种变化似乎对临床表型没有影响。它对 SEDL 基因表达水平和表达调控是否有影响目前还不清楚,需要进一步研究。

选择性剪接是多种剪接因子和调节因子相互作用的一个极其复杂的过程。它的调节是通过 hnRNP 和 SR 蛋白家族成员所识别的 RNA 正性和负性调接信号来实现的^[14]。目前对选择性剪接现象的研究仍然有大量的问题没有解决。我们的实验证实了 SEDL 基因存在选择性剪接,为进一步研究它的发生机制以及是否对 SEDL 基因表达调控有影响打下了基础。

从 RNA 水平研究基因突变的致病作用对进一步了解 SEDL 基因蛋白产物的功能及其在发病机制中的作用有十分重要的意义。本研究结果表明 SEDL 基因剪接点突变对其 mRNA 成熟和蛋白翻译有非常重要的影响。同时,对研究其他人类疾病基因剪接受体突变的致病机制也有一定意义。

参 考 文 献(References):

- [1] Iceton J A, Horne G. Spondylo-epiphyseal dysplasia tarda: The X-linked variety in three brothers. *J Bone Joint Surg*, 1986, 68 (4):616~619.
- [2] Whyte M P, Gottesman G S, Eddy M C, McAlister W H. X-linked recessive spondyloepiphyseal dysplasia tarda. Clinical and radiographic evolution in a 6-generation kindred and review of the literature. *Medicine*, 1999, 78(1):9~25.
- [3] Gedeon A K, Colley A, Jamieson R, Thompson E M, Rogers J, Sillence D, Tiller G E, Mulley J C, Gecz J. Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Nat Genet*, 1999, 22(4):400~404.
- [4] GAO Chao, LUO Qiang, WANG Huai-Li, GAO Xiao-Qun, FAN Qing-Tang, WANG Hua, SHENG Guang-Yao, ZHOU Jian-Hua, GAO Tie-Zheng. Identification of a novel mutation IVS2 -2A→C of SEDL gene in a Chinese family with X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Clin J Med Genet*, 2003, 20(1):15~18.
高 超, 罗 强, 王怀立, 高晓群, 范清堂, 王 华, 盛光耀, 周建华, 高铁铮. X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良家系 SEDL 基因突变研究. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(1), 15~18.

- [5] WANG Huai-Li, LUO Qiang, GAO Jian-Bo, GAO Tie-Zheng, HAO Lei. Report of a family with X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Clin Med China*, 2000, 16(8): 612~613.
王怀立, 罗强, 高建波, 高铁铮, 郝磊. 迟发性脊椎骨骺发育不良一家系报告. *中国综合临床*, 2000, 16(8): 612~613.
- [6] Krawczak M, Reiss J, Cooper D N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, 1992, 90(1-2): 41~54.
- [7] Maquat L E. Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet*, 1996, 59(2): 279~286.
- [8] Kozak M. Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(7): 2662~2666.
- [9] Sacher M, Jiang Y, Barrowman J, Scarpa A, Burston J, Zhang L, Schieltz D, Yates J R, Abeliovich H, Ferro-Novick S. TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J*, 1998, 17(9): 2494~2503.
- [10] Pennisi E. Human genome preject: and the gene number is ...? *Science*, 2000, 288(5469): 1146~1147.
- [11] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 860~921.
- [12] Mironov A A, Fickett J W, Gelfand M S. Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res*, 1999, 9(12): 1288~1293.
- [13] Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(13): 2850~2859.
- [14] van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco M T, Lozano J, Krainer A R, Moscat J, Caceres J F. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol*, 2000, 149(2): 307~316.

新锐科学人文杂志——《生命世界》

《生命世界》杂志是由中国科学院主管,中国科学院植物研究所、高等教育出版社和中国植物学会共同主办的大型科学人文杂志。她的前身是1974年创刊的《植物杂志》,于2004年4月改版,并重新定位:做中国最有影响力、最有公信力、最有市场的科学人文杂志。与国内其他科学杂志相比,《生命世界》拥有阵容最强大的专家咨询队伍——20余位院士和近100名知名科学家出任杂志的顾问和编委;《生命世界》拥有后盾最稳固的支撑管理机构——国内顶级的国立科研机构之一中国科学院植物研究所和我国最具实力的出版机构之一高等教育出版社。

《生命世界》追踪生命科学的动态变化和最新观点,关注与生命有关的新闻事件及科学背景,呼唤对生命与自然的珍视与反思。《生命世界》是一个充分展示生命科学魅力的舞台。她不会向你普及枯燥乏味的科学概念,只会给你讲述科学背后的人与事。她呈现给读者的是一个有血有肉、富有感情色彩的生命科学家形象;一段段鲜为人知、具有故事情节的探索研究历程;一张张精美清晰、带有视觉冲击力的科考照片和科学示意图。《生命世界》以前沿的视角、活泼的文字、精美的图片来实现其科学性、人文性与艺术性的融合;倡导积极的生活态度、理性的生活方式和时尚的生活品味。

《生命世界》(月刊) CN11-5272/Q 邮发代号 2-815,定价 15 元,全年 180 元。直接到编辑部订阅一年 150 元,二年 270 元。欢迎订阅,欢迎刊登产品与服务广告。

地址:北京市西城区德外大街 4 号,高等教育出版社《生命世界》杂志社

邮政编码:100011 联系人和电话:舒欣:13811605616 赵鹏:1351753797

《国外医学》遗传学分册

《国外医学》遗传学分册是中华医学会《国外医学》系列杂志之一,由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会、哈尔滨医科大学和黑龙江省医学科学院主办的国家级医学学术期刊,主要报道医学遗传学领域的新动态、新知识、新成果、新进展和新经验,在保留原综述性文章特色的基础之上,增设论著、短篇报道、学术争鸣、继续教育园地、海外学人园地、新技术新方法等栏目,报道国内外医学遗传学学术交流及进展状况。适合于从事医学遗传学以及相关学科的科研、教学和广大的临床医务工作者。以印刷版和电子版(“中国学术期刊光盘版”)向全国公开发行。

《国外医学》遗传学分册(ISSN 1001-1048, CN23-1160/R)为双月刊,全年 6 期。国内邮发代号 14-55。

2004 年定价 6 元,全年 36 元。 2005 年定价 8 元,全年 48 元。 2006 年定价 8 元,全年 48 元。

欢迎到当地邮局订阅!本编辑部可以零售及补订。

本刊地址:哈尔滨市南岗区学府路 194 号 哈尔滨医科大学 邮政编码:150086

电话/传真:0451-86662947 E-mail:genetics@hrbmu.edu.cn